

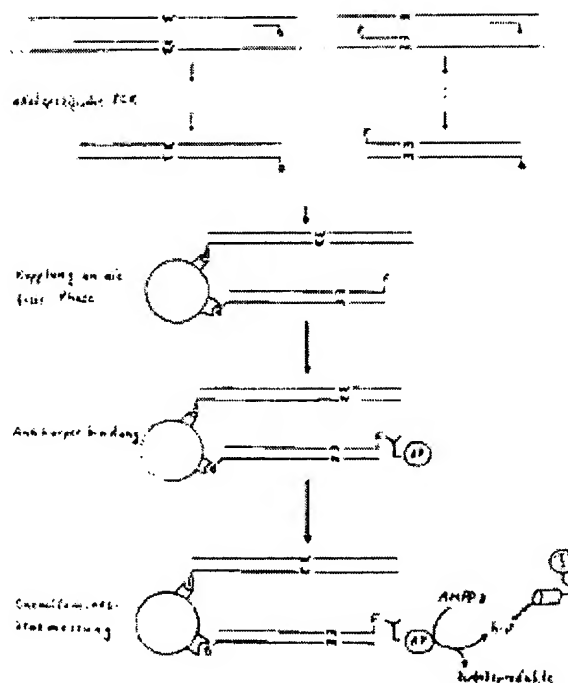
**Mutation detection in bio-polymers such as DNA and RNA with PCR - using specific, labelled primers, immobilising prods. after one cycle, adding enzyme-active antibodies and detecting primers by chemiluminescence**

**Patent number:** DE4212939  
**Publication date:** 1993-10-21  
**Inventor:** SCHOENFELS CHRISTOPH (DE); SCHOTTMANN BERND DR (DE); ALBRECHT STEFFEN DR (DE)  
**Applicant:** SCHOTTMANN BERND DR MED (DE)  
**Classification:**  
 - international: **C12Q1/68; C12Q1/68; (IPC1-7): C12Q1/68; G01N33/53**  
 - european: **C12Q1/68D2G**  
**Application number:** DE19924212939 19920418  
**Priority number(s):** DE19924212939 19920418

**Report a data error here**

**Abstract of DE4212939**

A method for direct qualitative and quantitative detection of mutations in biopolymers (e.g. DNA, RNA) is claimed comprising (i) prodn. of specifically labelled prods. by an allele specific PCR (ii) sepg. (i) by solid phase techniques, (iii) incubating (ii) with enzymatically labelled antibodies (ABs), and (iv) detection of (iii) by chemiluminescence. Pref., the primer for the opposite strand is biotin-labelled and the mutant primer is labelled with fluorescein or vice versa. **USE/ADVANTAGE** - The method is more sensitive and cheaper than known methods (1 mutant can be detected in a pool of 1000 DNA probes). The PCR prods. from a reaction which is only specific for one allele are coupled to a solid phase and indirectly detected by the labelled primer. This is in contrast to prior art methods where PCR prods. are not detectable after the first PCR reaction.



Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift  
⑩ DE 42 12 939 A 1

⑤1 Int. Cl.<sup>5</sup>:  
C 12 Q 1/68  
G 01 N 33/53

②1 Aktenzeichen: P 42 12 939.7  
②2 Anmeldetag: 18. 4. 92  
④3 Offenlegungstag: 21. 10. 93

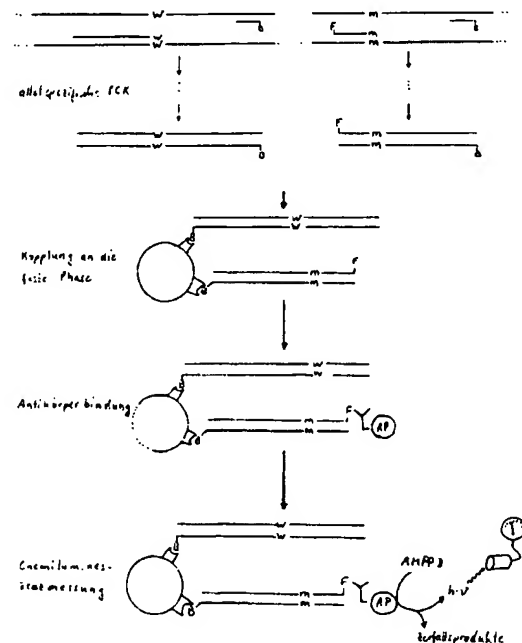
DE 42 12 939 A 1

⑦1 Anmelder:  
Schottmann, Bernd, Dr. med., 09599 Freiberg, DE

⑦2 Erfinder:  
Schönfels, Christoph, O-8030 Dresden, DE;  
Schottmann, Bernd, Dr., O-9200 Freiberg, DE;  
Albrecht, Steffen, Dr., O-8019 Dresden, DE

⑤4 Verfahren zum analytischen Nachweis von Mutationen in informationstragenden Biopolymeren

⑤7 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum direkten qualitativen und quantitativen Nachweis von Mutationen in informationstragenden Biopolymeren, wie z. B. DNA oder RNA. Sie ist geeignet für ein Pool-Screening, wo eine mutierte (positive) Probe im Pool neben vielen nichtmutierten (negativen) Proben herausgefunden werden kann. Somit ergeben sich deutliche ökonomische Vorteile gegenüber herkömmlichen Verfahren. Ein hochsensitives Detektionsverfahren auf der Basis enzymkatalysierter Chemilumineszenz ist wesentlicher Bestandteil der Erfindungsbeschreibung. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß nach spezieller, allelspezifischer Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Vervielfältigung des interessierenden Biopolymerabschnittes Produkte mit spezifischen Markierungen hergestellt werden, deren Abtrennung aus dem Reaktionsgemisch durch Festphasentechnik erfolgt und nach Inkubation mit enzymmarkierten spezifischen Antikörpern die Detektionsreaktion zum Nachweis der Mutation durch Chemilumineszenzmessung bei Einsatz eines chemilumineszenten Enzymsubstrats realisiert wird.



DE 42 12 939 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 08. 93 308 042/239

4/53

## Beschreibung

## Stand der Technik

Neben älteren, sehr wenig spezifischen und nur mäßig empfindlichen Verfahren zum analytischen Nachweis von Mutationen, dokumentieren die Arbeiten von S. Rust et. al. (1), C. R. Newton et. al. (2), D. Y. Wu et. al. (3) und J. H. Kenten et. al. (4) den gegenwärtigen Stand der Technik:

1. Der Einsatz von drei Primern in die PCR erlaubt das simultane Amplifizieren des normalen sowie des mutanten Allels. Die Unterscheidung der Allele wird dadurch erreicht, daß neben der differentiellen Nukleotidbase am 3'Ende der beiden differenzierenden Primer zusätzlich Mismatchbasen bei der chemosynthetischen Darstellung eingebaut wurden. Darüber hinaus unterscheiden sich die beiden Primer noch dadurch, daß sie in unterschiedlicher Länge (z. B. 40mer für das normale Allel und 25mer für das mutante Allel) zum Einsatz kommen. Der dritte Primer ist der Gegenstrangprimer, mit dem die Länge des PCR-Produktes festgelegt wird. Die hohe Spezifität der PCR wird gewährleistet, indem die Nukleotidtriphosphatkonzentration von (ansonsten üblichen) 200 µM auf 2 µM und die Magnesiumchloridkonzentration von 1,5mM auf 0,5mM gesenkt werden. In der ersten Stufe der Reaktion wird die Information (Mutation vorhanden oder nicht) vom Template (Pool von 64 aliquotierten Patientenproben) abgelesen. Die Amplifikation umfaßt 20 Zyklen.

2. Nach diesen 20 Zyklen ist ein PCR-Produkt, welches unter derart limitierenden Bedingungen erzeugt wurde, mit der eingesetzten Detektionstechnik (Agarosegelelektrophorese) noch nicht sichtbar. Deswegen wird eine zweite PCR angeschlossen, die sich ebenfalls durch einige Besonderheiten auszeichnet. Zum einen wird der Gegenstrangprimer durch einen zweiten Gegenstrangprimer ersetzt, der innerhalb der vorher erzeugten PCR-Produkte liegt (semi-nested PCR) und zum anderen wird die Nukleotidtriphosphatkonzentration auf 20 µM angehoben. Der Einsatz des zweiten Gegenstrangprimers sichert das spezifische Amplifizieren der gewünschten PCR-Produkte. Die zweite PCR wird über 45 Zyklen durchgeführt.

## Literatur:

- (1) Rust, S., Deutsches Patentamt, P 41 29 653,
- (2) Newton, C. R.; Graham, A.; Hoptintall, L. E.; Powell, S. J.; Summers, C. Kalsheker, N. Smith, J. C. and Markham, A. F. "Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS)", Nucleic Acids Research, Vol. 17, Nr. 7, 1989, 2503—2515,
- (3) Wu, D. Y.; Ugozzoli, L.; Pal, B. K.; Wallace, R. B. "Allelespecific enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic DNA for diagnosis of sickle cell anemia", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 86, 1989, 2757—2760,
- (4) Kenten, J. H.; Casadei, J. C. Link, J. Lupold, S.; Willey, J.; Powell, M.; Rees, A. and Massey, R. "Rapid Electrochemiluminescence Assays of Polymerase Chain Reaction Products" Clin. Chem. Vol. 37, Nr. 9, 1991, 1626—1632

3. Die oben beschriebene PCR zeichnet sich durch

eine weitere Besonderheit aus. Diese besteht darin, daß der Primer für das mutante Allel im Überschuß in die Reaktion eingesetzt wird. Diese Modifikation dient dem Zweck, daß beim Vorliegen der Mutation (es soll ja ein mutantes Allel in 128 Allelen, entsprechend 64 diploiden Chromosomensätzen, detektiert werden) das entsprechende PCR-Produkt stärker amplifiziert wird, da es ja nur 1/128 des in die PCR eingesetzten Templates ausmacht.

Nachteilig hierbei ist, daß die Spezifität der PCR über insgesamt 65 Amplifizierungsschritte gesichert werden muß.

## Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Entwicklung eines neuen, ökonomisch günstigen und hochsensitiven Verfahrens zum spezifischen Nachweis von Mutationen in informationstragenden Biopolymeren, wie z. B. DNA oder RNA.

## Darlegung des Wesens der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist es, Mutationen in informationstragenden Biopolymeren spezifisch und sensitiv auch im Gemisch mit einem Überschuß an analogen, nicht mutierten Biopolymeren, nachzuweisen.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß zunächst eine allelspezifische Einschnitt-Polymerase-Kettenreaktion zur Vervielfältigung des interessierenden DNA- oder RNA-Abschnittes durchgeführt wird. Dabei kommen neben unmarkierten Primern simultan biotinylierte oder andere spezifisch markierte, z. B. mit einem Fluoreszenzfarbstoff oder Digoxigenin, zum Einsatz. Das PCR-Produkt, welches die Mutation enthält, ist dabei doppelt markiert. z. B. mit Biotin und Fluorescein. Die Abtrennung von überschüssigen Primern und anderen Nebenprodukten erfolgt durch Festphasentechnik mittels spezifisch, z. B. mit Streptavidin, beschichteten Dynabeads. Danach erfolgt die Inkubation der Dynabeads mit spezifischen (z. B. gegen Fluorescein oder Digoxigenin gerichteten) und enzymmarkierten Antikörpern. Nach einem Waschschrift erfolgt die Zugabe eines chemilumineszenten Enzymsubstrats und gleichzeitig werden die entstehenden Photonen in einem geeigneten Luminometer registriert. Durch Einsatz entsprechender Positivkontrollen kann das Verfahren unter Auswertung des integralen Lichtsignal über eine konstante Zeit geeicht und somit der eindeutige Nachweis der Mutation erbracht werden.

Mit der hier beschriebenen Methode ist es möglich, in einem Pool von bis zu 1000 analogen DNA-Proben eine mutierte herauszufinden.

## Vorteile des Verfahrens im Vergleich zum Stand der Technik sind

1. Durchführung von nur einer allelspezifischen PCR,
2. Kopplung der gebildeten PCR-Produkte an eine feste Phase (Dynabeads) via Biotinmarkierung am Gegenstrangprimer,
3. Bindung eines enzymkonjugierten spezifischen Antikörpers gegen das zweite Hapten (Fluorescein, Digoxigenin), welches sich am Primer für das mutante Allel befindet.
4. Höchstempfindliche Detektion der gebildeten

PCR-Produkte durch die Messung der Lichtausbeute durch den enzymatischen Umsatz eines Chemilumineszenzsubstrates (z. B. AMPPD).

#### Ausführungsbeispiel

1. Zunächst wurde genomische DNA, die bekanntermaßen heterozygot für eine Mutation im Apolipoprotein-B-Gen (Aminosäure 3500) ist, mit genomischer DNA, die bekanntermaßen keine Mutation enthält (= Wildtyp) im Verhältnis 1 : 8, 1 : 16, 1 : 32 und 1 : 64 (w/w) gemischt. Das entspricht einem Allelverhältnis von 1 : 16, 1 : 32, 1 : 64 bzw. 1 : 128.

2. Von diesen Gemischen wurden jeweils 1.4 µl in die PCR eingesetzt. Die PCR-Ansätze setzten sich folgendermaßen zusammen: 3.5 µl 10× PCR-Puffer, 3.5 µl 2mM dNTPs, 2.8 µl 4mM Primer CSB 1 (für das normale Allel), 4.2 µl 4mM Primer CSB 2—5 Fluorescein-Markierung am 5'-Ende (für das mutante Allel), 0.7 µl 4mM Primer CSB 3 Biotin-Markierung am 5'-Ende (Gegenstrangprimer) und Wasser ad 35 µl. Danach wurden die Ansätze für 5 Minuten bei 98°C zur Denaturierung der DNA inkubiert und auf 4°C abgekühlt. Nach Zugabe von je 0.175 µl Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl) wurden die interessierenden PCR-Fragmente mit 35 Zyklen unter den Bedingungen 94°C 30 Sekunden, 56°C 60 Sekunden und 72°C 30 Sekunden dargestellt.

3. Je 5 µl Dynabeads M-280 (Streptavidin beschichtet) wurden 2× mit 100 µl 1M NaCl/15mM Tris/HCl pH 7.5/1mM EDTA gewaschen und danach in 3 µl 1M NaCl in TE aufgenommen. 4 µl PCR-Produkt wurden mit 4 µl 2M NaCl in TE gemischt und zu den gewaschenen Dynabeads gegeben. Nach 30minütigem Schütteln wurden die beladenen Beads 2× mit PBS pH 7.4/1% Rinderalbumin (RSA) — jeweils 100 µl — gewaschen.

4. Anschließend sind die Dynabeads mit 50 µl PBS/RSA aufgenommen worden, welches monoklonale A(alkalische)-Phosphatase-markierte Anti-Fluorescein-Antikörper (1 : 50 nach Angaben des Herstellers) für 1 Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt wurden. Unspezifisch gebundene Antikörper bzw. Antikörperüberschuß wurden durch 2malige Wäsche mit PBS/RSA + 0.1% Tween-20 entfernt.

5. Die Dynabeads sind ein weiteres Mal mit 300 µl Carbonatpuffer (10mM, pH 9.3) gewaschen und dann in 200 µl Carbonatpuffer aufgenommen worden.

6. Zu den 200 µl Dynabead-Suspension wurden 300 µl Detektionslösung (10 ml Carbonatpuffer, 100 µl AMPPD, 1000 µl Sapphire-Amplifier) zugegeben und die Lichtemission in einem Berthold-Luminometer gemessen (Meßtemperatur 37°C).

7. Resultate:  
 Leerwert:  
 2733 RLU/s kein Zusatz von mutierter DNA  
 Meßwerte:

43262 RLU/s bei 1 : 16	} bezogen auf das Allelverhältnis
39367 RLU/s bei 1 : 32	
31960 RLU/s bei 1 : 64	
12301 RLU/s bei 1 : 128	

gnal, welches eine mutierte DNA-Probe im Pool anzeigt, erhält man im hier beschriebenen Beispiel bis zu einem Verhältnis von 1 : 512 (mutierte : nichtmutierte DNA-Proben).

#### Patentansprüche

1. Verfahren zum direkten qualitativen und quantitativen Nachweis von Mutationen in informations-tragenden Biopolymeren, wie z. B. DNA oder RNA, gekennzeichnet dadurch, daß nach spezieller, allelspezifischer Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Vervielfältigung des interessierenden Biopolymerabschnittes Produkte mit spezifischen Markierungen hergestellt werden, deren Abtrennung aus dem Reaktionsgemisch durch Festphasentechnik erfolgt und nach Inkubation mit enzym-markierten spezifischen Antikörpern die Detektionsreaktion zum Nachweis der Mutation durch Chemilumineszenzmessung bei Einsatz eines chemilumineszenten Enzymsubstrates realisiert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß die spezielle, allelspezifische PCR mit einem biotinylierten Gegenstrangprimer und einem Fluorescein-markierten Primer für das mutante Allel durchgeführt wird. Gleiches gilt, wenn die PCR mit Fluorescein-markiertem Gegenstrangprimer und biotinyliertem Primer für das mutante Allel durchgeführt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß die Detektionsreaktion durch Chemilumineszenzmessung an einem empfindlichen Luminometer gemessen wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß als chemilumineszentes Enzymsubstrat Luminolderivate, Luciferinderivate oder stabile Dioxetane, z. B. Adamantan- oder Benzofurandioxetene, eingesetzt werden.
5. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß bei der Detektion der Chemilumineszenz vorrangig die registrierten Lichtquanten der ersten 60 min. nach Substratzugabe genutzt werden.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

